

THESIS

MÜNICH

1967

Vergleichende experimentelle Untersuchungen  
über die Hemmung der Serumcholinesterase in vitro  
und in vivo mit dem kurz wirkenden Neostigmin  
und dem Langzeit-Hemmer Hexamarium

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

HEINZ PRÄUER

München

1967



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

AUS DER ANÄSTHESIEABTEILUNG DER CHIRURGISCHEN POLIKLINIK DER  
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr.med. F. Holle

Leiter der Anästhesieabteilung: Priv.-Doz. Dr.med. A. Doenicke

Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Hemmung  
der Serumcholinesterase in vitro und in vivo mit dem kurz wir-  
kenden Neostigmin und dem Langzeit-Hemmer Hexamarium

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

HEINZ PRÄUER

aus

Marienbad

München

1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.med. A.Doenicke  
Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. F. Holle  
Dekan: Prof.Dr.med. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 7.11.67

Dem Andenken meines Vaters gewidmet



## Inhaltsübersicht

|                                                                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Historischer Überblick .....                                                                             | 7     |
| B. Methodik .....                                                                                           | 9     |
| C. Hemmung der Serumcholinesterase .....                                                                    | 12    |
| I. Neostigmin .....                                                                                         | 14    |
| 1. In-vitro-Hemmung und Reaktivierung<br>der SChE nach Neostigmin .....                                     | 16    |
| 2. Vergleich zwischen Hemmung und Reaktivie-<br>rung der SChE nach Neostigmin in vivo und<br>in vitro ..... | 22    |
| 3. Der Einfluss der Serumproteine auf die<br>Hemmung der SChE durch Neostigmin .....                        | 24    |
| II. Hemmung der SChE durch Hexamarium .....                                                                 | 28    |
| D. Zusammenfassung .....                                                                                    | 36    |
| E. Literaturverzeichnis .....                                                                               | 37    |



Im Jahre 1914 entdeckte H. H. DALE das Acetylcholin. Die Bedeutung und Rolle dieses Stoffes im lebenden Organismus und seine Beziehung zu den nervösen Erregungsvorgängen konnte man damals allenfalls ahnen, erst in jahrzehntelanger Forschungsarbeit gelang es, über Lokalisation, Synthese, Wirkungsmechanismus und Abbau des Acetylcholins klarere Vorstellungen zu gewinnen. LOEWI und NAVRATIL fanden 1926 Acetylcholin nach Vagusreiz im Herzen und schrieben diesem Stoff den Vagus-Effekt zu. Das Verschwinden dieses "Vagus-Stoffes" führte LOEWI und ENGELHART 1930 zur Annahme eines Acetylcholin zerstörenden Fermentes, das sich auch in Herzmuskelextrakten nachweisen liess. Hydrolytische Spaltung von Acetylcholin und anderen Estern des Cholins durch Pferdeserum beobachtete 1932 STEDMAN (60) und bezeichnete dies dafür verantwortliche Enzym "Cholinesterase". Bald fand man, dass Serum von Mensch und Tier, rote Blutkörperchen und Gewebs-extrakte verschiedener Organe, besonders des Nervengewebes, Cholinester fermentativ abzubauen vermögen. Seit den Untersuchungen von ALLES und HAWES (2), MENDEL und Mitarbeitern (45) wissen wir, dass im Organismus zwei verschiedene Typen dieses Enzyms vorkommen; eine weitere Klassifizierung auf Grund quantitativer Unterschiede im Abbau verschiedener Substrate erfolgte durch ADAMS und WHITTAKER (1). In neuerer Zeit haben die Theorien von NACHMANSON (48) interessante und anschauliche Vorstellungen von der Rolle des Acetylcholins und der Acetylcholinesterase bei den nervösen Elementarvorgängen geliefert. Wir wissen heute, dass Acetylcholin als Überträgerstoff eine Schlüsselstellung bei allen nervösen Erregungsvorgängen an Synapsen, Nervenendigungen und an der motorischen Endplatte einnimmt. Doch erst durch die Anwesenheit von spezifischen Enzymen, die diese höchst wirksame und darum unter Umständen gefährliche Substanz rasch abbauen und unwirksam machen, wird eine gezielte und kontrollierte Wirkung und ein harmonisches Zusammenspiel der verschiedenen Schalt- und Regulationsvorgänge möglich. Das System Acetylcholin-Cholinesterase und dessen Beeinflussung durch Cholinesterase-Hemmer, chemische Substanzen, die die Abbaugeschwindigkeit für Acetylcholin vermindern, hat daher grosse Bedeutung für die

Pharmakologie, Toxikologie und Enzymchemie, aber auch für die praktische Medizin. Cholinesterase hemmende Stoffe werden seit langer Zeit therapeutisch auf vielen Gebieten der Medizin (Chirurgie, Gynäkologie, Urologie, Ophthalmologie und Neurologie) mit gutem Erfolg angewandt. In letzter Zeit hat die Gruppe der Ester spaltenden Enzyme im Zusammenhang mit modernen Narkoseverfahren grosses Interesse erlangt; schliesslich wird der Bestimmung der Esterasen eine gewisse Bedeutung in der Diagnostik von Lebererkrankungen beigemessen (14, 17, 24, 35, 43).

Die im menschlichen Blut vorkommenden Cholinesterasen können auf Grund ihrer Substratspezifität in verschiedene Typen differenziert werden:

1.) Die Serumcholinesterase (SChE)

Nach dem internationalen Enzym-Kodex werden hierzu zwei Enzyme gerechnet: a) die Acylcholin-Acyl-Hydrolase (E.C. 3.11.8), Trivialname Cholinesterase, Pseudocholinesterase b) die Benzoylcholin-Hydrolase (E.C. 3.11.9), Trivialname Benzoylcholinesterase.

2.) Die Acetylcholinesterase (AChE), Acetylcholin-Acetyl-Hydrolase, Trivialname: Acetylcholinesterase, echte, spezifische Cholinesterase.

Letztere ist ein Bestandteil der Erythrozytenmembranen. Die Frage, ob physiologischerweise im Serum eine Acetylcholinesterase vorkommt, ist nicht geklärt. MENDEL und Mitarbeiter (1943) nahmen an, dass im Serum nur Pseudocholinesterase vorhanden ist (45). Nach PILZ (53) sollen sich im Serum sogar zwei Acetylcholinesterasen und elf unspezifische Cholinesterasen nachweisen lassen. BREUER (7) gibt den Anteil der Acetylcholinesterase an der gesamten Acetylcholinspaltung im Serum mit 20 - 25 % an. Über eigene Untersuchungen siehe unten. Bevor von den Versuchen zur Hemmung der Cholinesterase die Rede sein soll, wird kurz auf die Untersuchungsmethoden eingegangen, mit denen die Enzymaktivität im Serum gemessen werden kann.

In der Literatur findet sich eine grosse Anzahl von Bestim-

mungsmethoden der Cholinesterasen im Serum. Dies erschwert die Übersicht, zumal die Messwerte der verschiedenen Methoden nicht immer vergleichbar sind. Tatsächlich können nur solche Ergebnisse miteinander verglichen werden, welche mit ein und derselben Methode gewonnen wurden. Andererseits erfordern spezielle Fragestellungen entsprechend geeignete Methoden. Für die Klinik haben sich die beiden Methoden nach METCALF und KALOW bewährt, die auch bei unseren Untersuchungen zur Anwendung kamen und kurz beschrieben werden sollen.

#### Methode nach METCALF

Dieser Bestimmungsmethode liegt das Prinzip zugrunde, dass Acetylcholin mit alkalischem Hydroxylamin unter Bildung von Acetylhydroxamsäure reagiert, die mit dreiwertigem Eisen ein braunes Komplexsalz bildet. Seine Konzentration kann photometrisch bestimmt werden. Die 5 zu verwendenden Reagenzien sind:

1. Phosphatpuffer von pH 7,2, der 0.004 molares Acetylcholinbromid enthält.
2. Zweimolare Hydroxylamin-HCl-Lösung.
3. 3,5 normale NaOH-Lösung.
4. 1 Volumteil HCl vom spezifischen Gewicht 1,118 mit 2 Volumteilen Aqua dest.
5. 0,37 molare Eisensalzlösung (Fe-III-Chlorid in 0,1 molarer HCl).

#### Untersuchungsgang:

5 mm<sup>3</sup> Serum werden mit 1 ml einer Acetylcholinbromidlösung versetzt und bei 37°C 30 min lang erwärmt (A). Zum Vergleich wird 1 ml derselben Lösung ohne Serumzusatz auf die gleiche Weise behandelt, die 5 mm<sup>3</sup> Serum aber erst nach der Erwärmung zugegeben (B). Anschliessend werden in folgender Reihenfolge die Reagenzien 2 und 3 (frisch gemischt je 1 ml) 4 und 5 je 1 ml angesetzt und sofort bei Wellenlänge 546 nm und Schlitzbreite 2 im Spektrophotometer untersucht. In der Lösung A wird im Wasserbad durch das im Serum enthaltene

Ferment eine bestimmte Menge Acetylcholin hydrolytisch gespalten. Es kann sich also weniger braunes Komplexsalz bilden als in Lösung B. Aus der Differenz der Werte A und B ergibt sich die Menge Acetylcholin, die von in  $5 \text{ mm}^3$  Serum vorhandener Cholinesterase bei  $37^\circ\text{C}$  in 30 min gespalten wird. Dies kann als Mass für die Ferment-Aktivität dienen. Multipliziert man die Extinktionsdifferenz mit 1000, so erhält man bei Gesunden Werte um 100.

#### Methode nach KALOW

Als Substrat wird eine Benzoylcholin-Lösung verwendet, die bei 240 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Esterase-Aktivität einer Serumverdünnung zeigt sich in einer laufenden Abnahme der Extinktion, die über 3 min verfolgt wird.

#### Untersuchungsgang:

Serum wird mit M/15 Phosphatpuffer von pH 7.4 1:100 verdünnt. In einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) werden 2 ml dieser Verdünnung mit 1 ml Phosphatpufferlösung versetzt und 1 ml einer Benzoylcholinchlorid-Lösung ( $2 \cdot 10^{-4}$  molar) zugesetzt. Die Extinktion des Gemisches wird bei einer Wellenlänge von 240 nm gegen die mit Phosphatpuffer 1:1 verdünnte Esteraselösung (Serumverdünnung) gemessen. Nach genau 3 min wird die Extinktion abermals bestimmt. Die Messungen erfolgen bei  $26^\circ\text{C}$ . Die Extinktionsdifferenz - als Mass der Enzymaktivität - mit 1000 multipliziert ergibt für Normalpersonen Werte zwischen 80 und 130.

Da Acetylcholin sowohl von der Serumcholinesterase als auch von der spezifischen Acetylcholinesterase hydrolytisch gespalten wird, Benzoylcholin aber das spezifische Substrat für die Serumcholinesterase ist, erfassen wir mit keiner der beiden Methoden eine womöglich im Serum vorhandene Acetylcholinesterase für sich allein. Das spezifische Substrat der echten Acetylcholinesterase ist nach ADAMS und WHITTAKER Acetyl- $\beta$ -methylcholin. Zum Nachweis von AChE im Serum haben wir die Methode nach METCALF in der Weise modifiziert, dass statt Acetylcholin als Substrat das  $\beta$ -methyl-Derivat des Acetylcholins

in gleicher Konzentration angewandt wurde. Der übrige Untersuchungsgang wurde nicht verändert. In 10 Seren wurde jeweils parallel die Spaltung von Acetylcholin und Acetyl- $\beta$ -methylcholin gemessen. Der Anteil der Acetyl- $\beta$ -methylcholin-Spaltung betrug durchschnittlich 23 % der Acetylcholin-Spaltung im Serum (siehe Tab. 1). Die Spaltung von Acetylcholin im Serum geschieht demnach überwiegend durch unspezifische Cholinesterasen, ein bestimmter Anteil jedoch durch eine Acetylcholinesterase. Der gefundene Wert stimmt gut mit der von BREUER ermittelten Quote von 20 - 25 % überein.

| Methode   | Metcalf      | Metcalf mod.                  |                      |
|-----------|--------------|-------------------------------|----------------------|
| Substrat  | Acetylcholin | Acetyl- $\beta$ -methylcholin | % der Gesamtspaltung |
| Versuch 1 | 0.101        | 0.043                         | 43 %                 |
| 2         | 0.086        | 0.014                         | 16 %                 |
| 3         | 0.107        | 0.024                         | 22 %                 |
| 4         | 0,075        | 0.013                         | 18 %                 |
| 5         | 0.059        | 0.020                         | 34 %                 |
| 6         | 0.108        | 0.022                         | 20 %                 |
| 7         | 0.145        | 0.028                         | 19 %                 |
| 8         | 0.068        | 0.014                         | 21 %                 |
| 9         | 0.101        | 0.018                         | 18 %                 |
| 10        | 0.064        | 0.012                         | 19 %                 |

Durchschnitt 23 %

Tab. 1.

Der Anteil der Acetylcholinesterase an der Spaltung von Acetylcholin im Serum.

Über die Herkunft dieser Acetylcholinesterase im Serum können

wir keine Aussagen machen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um bei der Aufbereitung der Seren frei werdende Erythrozyten-Cholinesterase, demnach um ein Artefact. In diesen Voruntersuchungen sollte nur gezeigt werden, dass bei der Metcalf'schen Bestimmungsmethode auch andere Substrate verwandt werden können, die geeignet sind, die oben erwähnte Acetylhydroxamsäure zu bilden. Die Abb. 1 zeigt nochmals die verschiedenen Substrate der beiden Cholinesterasen und die darauf aufbauenden Bestimmungsmethoden.

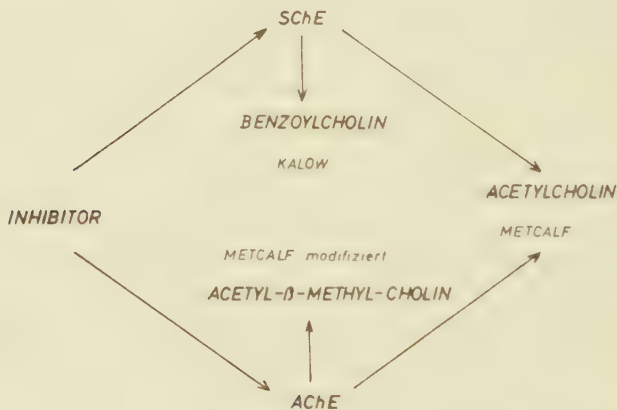


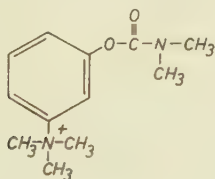
Abb. 1

### Hemmung der Serumcholinesterase

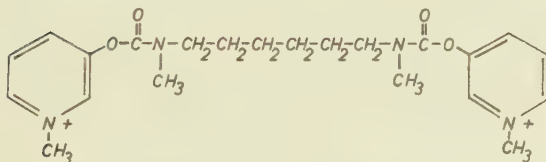
Die Entdeckung des klassischen Cholinesterase-Hemmers Physostigmin (Eserin) geht ebenfalls auf Arbeiten von LOEWI und NAVRATIL (1926) zurück (41). Die meisten heute therapeutisch verwendeten synthetischen Cholinesterase-Hemmer leiten sich von Physostigmin ab und stellen Ester der Carbaminsäure dar. Neben diesen Carbamaten besitzen die Alkylphosphate und Methansulfonate mehr toxikologisches Interesse. Cholinesterase hemmende Stoffe werden klinisch angewandt, um die an den Sy-

napsen lokalisierte Acetylcholinesterase zu blockieren und damit an den vegetativ innervierten Organen einen para sympathikomimetischen Effekt zu erzielen bzw. den Tonus der Skelettmuskulatur zu steigern. Gleichzeitig wird jedoch auch die Serumcholinesterase gehemmt. Dieser Effekt lässt sich im Versuch in bequemer Weise verfolgen und erlaubt wichtige Rückschlüsse auf die Eigenschaften und Wirkungsweise des Hemmers.

Unsere experimentellen Untersuchungen galten dem zeitlichen Ablauf der Hemmung der Cholinesterase im menschlichen Serum in vivo und in vitro. Wir bedienten uns dabei des seit langem therapeutisch angewandten Neostigmins<sup>+</sup> und des erst seit wenigen Jahren in die Klinik eingeführten Langzeit-Hemmers Hexamarium<sup>++</sup>, beide vom Typ der Carbamate (siehe Abb. 2).



NEOSTIGMIN (Prostigmin)



HEXAMARIUM (Ubretid)

Abb. 2

+ Warenzeichen Prostigmin (ROCHE)

++ Warenzeichen Ubretid (LENTIA GmbH München)

## NEOSTIGMIN

### Versuchsanordnung:

Gesunden Versuchspersonen und Patienten wird 0,5 mg Neostigmin in die Cubitalvene injiziert und nach 2, 5, 10 usw. Minuten werden mittels einer am anderen Arm liegenden Kunststoffkanüle (Braunüle) Blutproben entnommen. Zu Beginn des Versuches ist aus derselben Braunüle Blut entnommen worden zur Bestimmung des Cholinesterase-Ausgangswertes. Die Blutentnahmen - in wachsenden zeitlichen Abständen - werden bis zu 2 Stunden nach Verabreichung des Hemmers vorgenommen. Die gewonnenen Blutproben werden zentrifugiert, die überstehenden Seren dekantiert und anschliessend nach METCALF und KALOW auf Cholinesterase untersucht. Die am Versuchstag erhaltenen und gemessenen Seren werden weiterhin im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt und an den folgenden Tagen untersucht.

### Ergebnisse:

Eine Serie von 5 derartigen Versuchen mit über 200 Einzelbestimmungen lieferte folgende Resultate. Bereits in der ersten Blutprobe (2 min nach Neostigmin) ist die  $3\text{ChE}$ -Aktivität stark herabgesetzt (durchschnittlich um 45 %), in den folgenden Seren nahm die Aktivität rasch wieder zu, aber sprunghaft und ganz unregelmässig. Das einzige gemeinsame Merkmal in allen 5 Kurvenbildern ist der tiefe Abfall der Cholinesterase-Aktivität nach 2 Minuten. Untersucht man die einzelnen Seren an den darauffolgenden Tagen wieder auf Cholinesterase-Aktivität, so findet man in allen Fraktionen ein langsames Ansteigen der Enzym-Aktivität, gelegentlich auch stärkere Hemmung, schliesslich wird der Ausgangswert fast wieder erreicht. In den Proben spielen sich demnach auch bei Kühlschranktemperatur mannigfaltige Reaktionen ab.

### Diskussion:

Diese Ergebnisse, die nicht mit den klinischen Erfahrungen übereinstimmen, nämlich, dass Neostigmin bereits nach 2 Minuten die maximale Wirkung entfalten sollte, die nur wenige Minuten andauert, liessen uns an der Richtigkeit dieser Ergebnisse zwei-

feln und waren der Anlass zu einigen grundsätzlichen Überlegungen.

Wenn wir ein Enzym mit einem Hemmkörper vom Typ des Neostigmins blockieren, so spielen sich vereinfacht folgende Teilreaktionen mit jeweils bestimmten Geschwindigkeitskonstanten ab:

- 1.) Der Hemmer bildet mit dem Enzym einen Komplex. Für die Komplexbildung sind bestimmte Atomgruppierungen am Enzymmolekül (Haftpunkte, aktive Stellen) massgeblich, im Falle der Cholinesterase eine "anionische Seite", die zu kationischen Molekülstrukturen (quaternäres Stickstoffatom der Carbamate) Beziehung aufnehmen kann, und eine "esteratische (esterspaltende) Seite" (WILSON 1960).
- 2.) Das Enzym spaltet den Hemmkörper als "falsches Substrat". Diese hydrolytische Spaltung muss aber im Vergleich mit der Substrathydrolyse längere Zeit in Anspruch nehmen. Beim Vorgang der Substratspaltung (Acetylcholin) tritt als Zwischenprodukt das acetylierte Enzym auf, der Acetylrest dissoziiert aber rasch ab. Bei der Reaktion zwischen Enzym und Hemmer werden schwer abspaltbare Säurereste, im Fall der Carbamate der Carbaminsäurerest, an das Enzym übertragen und es entsteht als Zwischenprodukt das relativ stabile Carbamyl-Enzym. Während dieser Phase steht das Enzym zum Abbau des physiologischen Substrats nicht bereit. WILSON bezeichnet daher diese Inhibitoren als "schlechte Substrate".
- 3.) Die Spaltstücke dissoziieren einzeln entsprechend ihren kinetischen Konstanten vom Enzymmolekül ab, worauf dieses seine Aktivität wiedergewinnt. Der wesentliche Unterschied zwischen Substrathydrolyse und Zerstörung des Hemmkörpers liegt demnach in der quantitativen Verschiedenheit der kinetischen Konstanten.

Alle diese Einzelreaktionen laufen am Einzelmolekül nacheinander ab, betrachten wir aber eine Summe von Enzym- und Inhibitor-molekülen, so spielen sich die einzelnen Reaktionsschritte gleichzeitig nebeneinander ab. Während einzelne Inhibitormoleküle bereits einen Komplex mit dem Enzym gebildet haben, haben andere Moleküle noch keine Beziehung zu den Enzymproteinen auf-

genommen. Sobald der erste Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet ist, setzt auch bereits die Spaltung und Reaktivierung des Enzyms ein. Da aber den einzelnen Reaktionen unterschiedliche kinetische Konstanten eigen sind, werden zu bestimmten Zeiten jeweils bestimmte Reaktionen überwiegen und den Ausschlag für die von aussen wahrnehmbare Reaktion des Kollektivs geben.

Applizieren wir einen Hemmkörper und versuchen wir nach einiger Zeit den Grad der Hemmung der Cholinesterase im Serum zu ermitteln, so haben wir mit diesen Reaktionen zu rechnen, die vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Messung und auch noch während der Messung mit einer der jeweiligen Temperatur entsprechenden Geschwindigkeit ablaufen und das Resultat verfälschen (BAMMER, MAIER, 42). Die gemessenen Werte liegen zu hoch oder zu niedrig je nach dem, in welcher Phase die Bestimmung vorgenommen wird, jedenfalls entsprechen sie nicht der aktuellen Enzymaktivität zum Zeitpunkt der Blutentnahme. SCHAUMANN (59) wies 1960 darauf hin, dass die Resultate besonders ungünstig bei kurzfristig wirkenden Hemmern wie Neostigmin seien.

Um den tatsächlichen Wert der Cholinesteraseaktivität im Augenblick der Blutentnahme annähernd richtig zu bestimmen, muss die Zeitspanne zwischen Abnahme und Messung möglichst klein gehalten werden und die Blutproben sofort abgekühlt und bis zum Zeitpunkt der Messung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Dies wurde bei den folgenden Untersuchungen berücksichtigt.

#### In-vitro-Hemmung und Reaktivierung der SChE nach Neostigmin

##### Versuchsanordnung:

Eine Versuchsperson, deren Cholinesterase-Ausgangswert zunächst bestimmt wird, erhält 0,5 mg Neostigmin in die Cubitalvene injiziert. Nach 2 Minuten wird aus einer Vene des andern Armes Blut entnommen und sofort in Eiswasser eingebracht. Nach dem Absetzen der Erythrozyten wird zentrifugiert und das Serum in 4 Fraktionen aufgeteilt, von denen die erste sofort nach KALOW auf Cholinesterase-Aktivität bestimmt wird. Die restlichen

Fraktionen werden jeweils 5, 10 und 15 Minuten lang im Wasserbad von 37°C erwärmt und anschliessend Proben zur Bestimmung entnommen. Die 4 Seren, die sich nur durch verschieden lange Incubationszeiten bei 37°C unterscheiden und den Hemmstoff in gleicher Konzentration enthalten, werden sofort wieder abgekühlt und das Verhalten der Cholinesteraseaktivität bei Kühl-schranktemperatur über mehrere Tage hin verfolgt.

### Ergebnisse:

In dem 2 Minuten nach der Injektion des Hemmers gewonnenen Serum ist die Aktivität der Cholinesterase nur wenig abgesunken, fraktioniertes Erwärmen bei 37°C senkt jedoch stufenweise die Fermentaktivität (siehe Abb. 3).

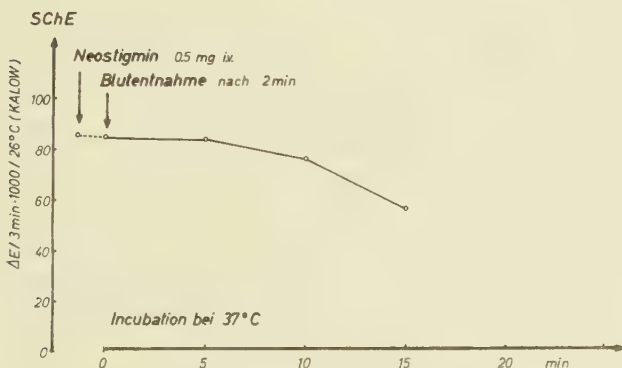


Abb. 3. In-vitro-Verhalten der SChE in einem 2 min nach i.v. Injektion von 0,5 mg Neostigmin gewonnenen Serum während Inkubation bei 37°C.

Da es sich um ein und dasselbe Serum handelt, geht daraus hervor, dass unmittelbar nach der Injektion des Hemmkörpers nur ein kleiner Teil der Inhibitor-moleküle mit dem Enzym reagiert hat, der Rest aber noch frei im Serum vorliegt, höchst

wahrscheinlich an Serumproteine gebunden (KNOLL, KOMLÖS, TARDOS), nach LATKI und ERDMANN (39) als sog. "paraesteratischer" Hemmer. Während der Inkubation bildet sich langsam der Enzym-Inhibitor-Komplex aus und es tritt eine der Hemmstoffkonzentration im Serum entsprechende Blockierung des Enzyms ein. Setzt man die Inkubation fort, so beobachtet man einen allmählichen Anstieg der Enzymaktivität; durch Spaltung des Inhibitors gewinnt das Enzym seine Aktivität zurück, schliesslich wird der Ausgangswert wieder erreicht. Abb. 4 zeigt 2 charakteristische Kurvenverläufe aus dieser Versuchsserie.

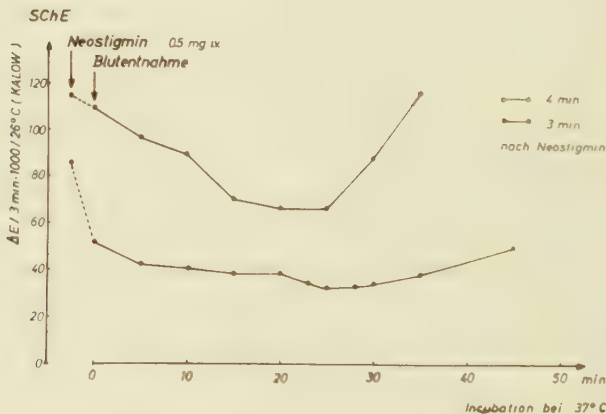


Abb. 4. In-vitro-Verhalten der SChE in 2 Seren, die nach i.v. Injektion von 0,5 mg Neostigmin gewonnen wurden.

Dieselben Reaktionen spielen sich auch bei Kühlschranktemperatur ab, jedoch mit entsprechend niedriger Geschwindigkeit. Die 4 Serumfraktionen vom ersten Versuch (Abb. 3), die mit a, b, c und d bezeichnet seien, wobei Serum a nicht, Serum b 5 min usw. bei 37°C vorinkubiert wurde, werden bei Kühlschranktemperatur weiter verfolgt bezüglich ihrer Cholinesterase-

se-Aktivität. Abb. 5 zeigt ihr Verhalten während der folgenden Tage. Serum a weist am nächsten Tag einen sehr niedrigen SchE-Wert auf entsprechend Serum d nach 15 Minuten Inkubationszeit, an den folgenden Tagen langsame Regeneration der Enzymaktivität. Serum d, das ja schon vollständig gehemmt war entsprechend der Hemmstoffmenge im Serum, zeigt lediglich einen langsamen Anstieg der Enzymaktivität; die Seren b und c befinden sich zunächst in der Phase zunehmender Hemmung, um dann ebenfalls ihre Aktivität wiederzugewinnen. Zwischen dem 4. und 5. Tag erreichen alle Seren einen Endwert, der nur wenig unter dem Ausgangswert liegt. Die Aktivität des Leerserums ist in der Zwischenzeit unverändert geblieben. Vergl. hierzu auch Abb. 6.

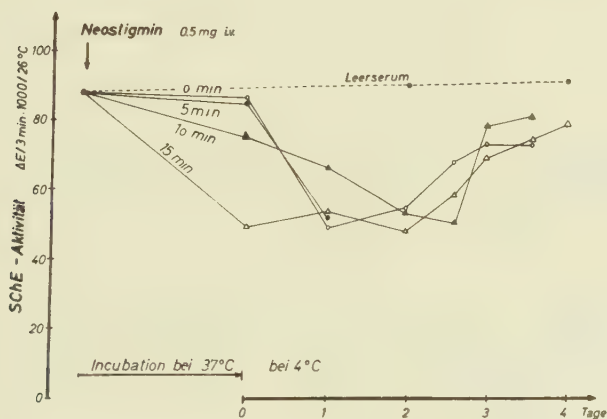


Abb. 5. In-vitro-Verhalten der SchE in einem 2 min nach i.v. Injektion von 0,5 mg Neostigmin gewonnenen Serum während Inkubation (37°C) und bei Kühlschranktemperatur.

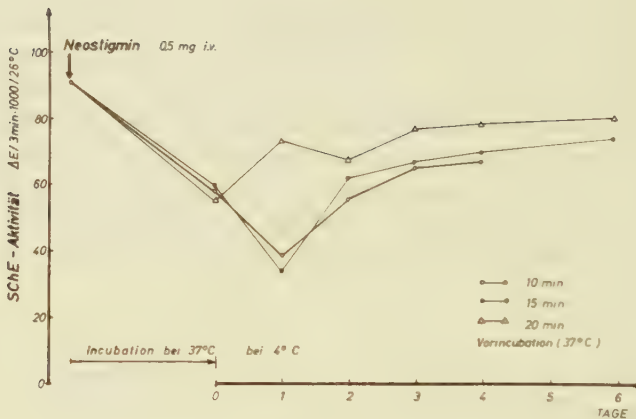


Abb. 6. In-vitro-Verhalten der SChE in einem 2 min nach i.v. Injektion von 0,5 mg Neostigmin gewonnenen Serum während Inkubation ( $37^\circ\text{C}$ ) und bei Kühlschranktemperatur.

In vitro tritt also auch bei Kühlschranktemperatur eine fast vollständige Reaktivierung der mit Neostigmin blockierten Cholinesterase ein. Die geringfügige Abnahme der Enzymaktivität in vitro bzw. ein bestehenbleibendes Aktivitätsdefizit kann folgendermassen gedeutet werden:

- 1.) Die Enzymproteine als komplizierte Molekülstrukturen zerfallen durch Alterung im Sinne einer Entropievermehrung.
- 2.) Im Reagenzglas haben wir ein geschlossenes System vor uns, in dem sich zwischen den Reaktionspartnern - Enzym, Inhibitor, Enzym-Inhibitor-Komplex, Spaltprodukte - ein Gleichgewichtszustand einstellt, der durch die Konzentrationen der Reaktionspartner und die kinetischen Konstanten der Einzelreaktionen bestimmt ist. Es darf auch nicht unberücksichtigt bleiben, dass

die Cholinesterase nach der Definition von Enzymen auch die Resynthese des Hemmers katalysiert, allerdings nur bis zu einer der Gleichgewichtskonstanten entsprechenden Konzentration.

Im lebenden Organismus jedoch, der ein offenes System darstellt, wird durch verschiedene Vorgänge - Verteilung, Elimination der Spaltprodukte, Zustrom neugebildeter Enzymmoleküle - verhindert, dass sich das energiearme chemische Gleichgewicht einstellt; vielmehr wird der Zustand des Fließgleichgewichtes aufrechterhalten, in dem biochemische Reaktionen quantitativ ablaufen können.

Die oben beschriebenen Versuche stellen keine reinen in-vitro-Untersuchungen dar, da die Hemmstoffkonzentrationen in den Seren bei den einzelnen Versuchen nicht genau bekannt und nicht konstant sind, sondern jeweils von der Kreislaufgrösse der Versuchsperson, von der Verteilung in der Körperflüssigkeit, von der Fixierung im Gewebe abhängig ist. Präzise quantitative Aussagen, wie sie reine in-vitro-Versuche mit genau definierter Hemmstoffkonzentration ermöglichen, können nicht erwartet werden, vielmehr werden bei unseren Versuchen die jeweiligen Kreislaufverhältnisse, Verteilung und Enzymaktivität eines Einzelindividuums berücksichtigt. Da die Schwankungsbreite der Serumcholinesteraseaktivität zudem sehr gross ist, stellt jede Applikation eines Cholinesterasehemmers ein pharmakologisches Experiment dar. Verschiedene atypische Formen der Serumcholinesterase sind von KALOW und GENEST (34) beschrieben worden und Methoden angegeben worden, um diese Varianten zu erfassen. Selbst Fehlen der Serumcholinesterase ("Anenzymie" DOENICKE et. al., 16 - "silent gene" LIDELL, LEHMANN, SILK, 40) ist beobachtet worden und tritt normalerweise nicht in Erscheinung, sofern das Individuum nicht einer Narkose mit modernen Relaxantien unterzogen wird, für deren Abbau die Serumcholinesterase nach Überwiegender Ansicht verantwortlich ist. Die dabei auftretenden Zwischenfälle werfen etwas Licht auf die Frage nach der eigentlichen Bedeutung der Cholinesterase im Serum, nämlich eventuell ins Serum gelangtes Acetylcholin rasch zu zerstören.

Den in unseren ersten Versuchen regelmässig beobachteten

tieften Abfall der Serumcholinesteraseaktivität bereits nach 2 min können wir nun gut erklären. Er entspricht nicht den wahren Verhältnissen, vielmehr tritt diese starke Hemmung erst in vitro in der Zeit zwischen Blutentnahme und Messung ein. Da 2 min nach der Injektion des Hemmers die Konzentration im Serum hoch ist, beobachten wir in vitro eine starke Hemmung; in vivo wird der Hemmkörper rasch verteilt und abgebaut, bevor noch alle Inhibitor-Moleküle ihre Hemmwirkung entfalten können. Die in den später gewonnenen Serumfraktionen ermittelte Aktivität liegt zu hoch, da die Messung nunmehr in die Phase der Spontanreaktivierung fällt. Ähnliche Kurvenbilder mit tiefem Abfall der Serumcholinesteraseaktivität unmittelbar nach Injektion von Neostigmin sind kürzlich von BARROW und JOHNSON (6) veröffentlicht worden. Es besteht allerdings ein Unterschied in Vergleich mit unseren Versuchen sowohl in der Dosierung des Hemmers als auch in der Bestimmungsmethode.

#### Vergleich zwischen Hemmung und Reaktivierung der SChE nach Neostigmin in vivo und in vitro.

Die bei den oben beschriebenen in-vitro-Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse werden nunmehr bei in-vivo-Versuchen berücksichtigt und mit in-vitro-Werten im Parallelversuch verglichen.

#### Untersuchungsgang:

0,5 mg Prostigmin wird Versuchspersonen intravenös injiziert, in verschiedenen Zeitabständen werden Blutproben entnommen, sofort in Eiswasser eingebracht, nach dem Absetzen der geformten Bestandteile des Blutes wird zentrifugiert und die Seren sofort nach KALOW bestimmt. Die erste Blutentnahme erfolgt 2 min nach Neostigmin. Der gemessene Wert stellt den in-vivo-Wert nach 2 min dar; der Rest dieser Serumfraktion wird bei 37°C inkubiert und das Verhalten der SChE mit den in-vivo-Werten verglichen.

#### Ergebnisse:

Vergleicht man die in-vivo-Werte mit dem Verlauf in vitro

(Abb. 7), so zeigt das Kurvenbild, dass sich offenbar in beiden Fällen ähnliche Vorgänge an den Enzymproteinen abspielen, dass aber die Kurve der in-vitro-Werte deutlich tiefer liegt und die Cholinesterase längere Zeit gehemmt bleibt als in vivo. Die Dauer der Hemmung der Cholinesterase in vivo lag in unserer Versuchsserie (5 Versuche) zwischen 30 und 90 min. In vitro stellt sich während der Inkubation die SChE auf den der Hemmstoffkonzentration im Serum 2 min nach Applikation des Hemmers entsprechenden Wert ein und steigt dann langsam an. In vivo wird dieser tiefe Abfall nicht beobachtet, da sich durch weitere Verteilung des Hemmers, Nachschub von Enzym und Elimination der Spaltprodukte ein anderes Gleichgewicht einstellt. Bei 2 Probanden (klinisch gesunde Studenten), die als Kind an Hepatitis erkrankt waren, lag der Cholinesterasewert unter dem physiologischen Schwankungsbereich, der Abfall nach Neostigmin war jedoch verhältnismässig gering. Womöglich liegen hier noch unbekannte Regulationsmechanismen zugrunde, sodass der Cholinesteraseausgangswert nicht unbedingt Schlussfolgerungen über den zu erwartenden Abfall nach Anwendung von Cholinesterase-Hemmern zulässt.

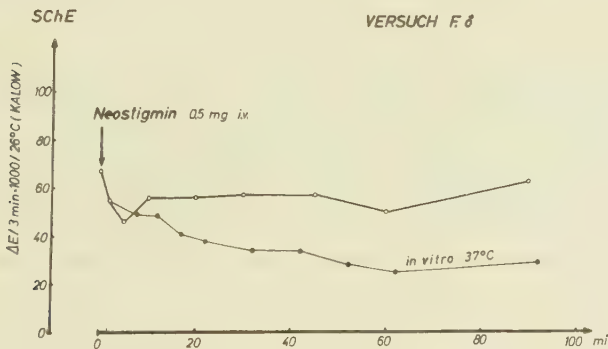


Abb. 7. SChE-Aktivität nach i.v. Injektion von 0,5 mg Neostigmin. Parallel dazu das Verhalten in vitro während der Inkubation.

Hier soll noch einmal kurz auf die Untersuchungsmethoden und deren Problematik eingegangen werden. Bei den vorausgegangenen Versuchen sahen wir zunächst von der Methode nach METCALF ab und bestimmten nur nach KALOW. Bei der METCALF'schen Methode wird das Serum mit dem Substrat (ACh) 30 min lang bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgen bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Inhibitors die oben beschriebenen Reaktionen zwischen Enzym und Hemmkörper. Die fortschreitende Blockierung des Fermentes durch noch freie, nicht enzymgebundene Inhibitor-Moleküle soll nach Zugabe des Substrats unterbrochen werden (SCHAUMANN, 59), die Spaltung des bereits enzymgebundenen Hemmers schreitet jedoch fort. Entsprechend der hierdurch bedingten Reaktivierung des Enzyms während der Inkubation müssen die gemessenen Werte zu hoch liegen. Bei der KALOW'schen Methode wird die Serumverdünnung erst unmittelbar vor der Bestimmung mit dem Substrat zusammengebracht und auf 26°C erwärmt; die gewonnenen Werte entsprechen daher besser den tatsächlichen Verhältnissen, allerdings gilt zu berücksichtigen, dass durch die Verdünnung des Serums ein Teil der Inhibitor-Moleküle von den Enzymproteinen abgewaschen wird.

#### Der Einfluss der Serumproteine auf die Hemmung der Cholinesterase durch Neostigmin

Es wurde bereits erwähnt, dass ein grosser Teil des zugeführten Hemmers zunächst an die Serumproteine gebunden wird, nach FOLDES<sup>+</sup> über 90 % des injizierten Hemmers. Ein Teil dieser Eiweisskörper sind Enzymproteine (Cholinesterase) und spalten den Hemmer, worauf dessen Platz wieder von zunächst an andere Eiweisskörper gebundenen Hemmstoffmolekülen eingenommen wird. So stellt sich ein Fliessgleichgewicht ein, der Hemmer geht langsam von den Serumproteinen auf das Enzym über, das Enzym ist zu einem bestimmten Prozentsatz gehemmt. Die Serum-eiweisskörper fangen den Hemmer zum grössten Teil ab und geben nach und nach einzelne Inhibitor-Moleküle an das Enzym ab; das Enzym

+ persönliche Mitteilung

wird daher nicht abrupt blockiert, die Wirkung des Hemmers wird protrahiert. Schliesslich ist der ganze Hemmstoff verbraucht und das Enzym gewinnt seine Aktivität wieder. Dies gilt in ähnlicher Weise für eine grosse Anzahl zugeführter Medikamente. Es stellt sich nun die Frage, was geschieht, wenn ein Teil dieser Haftpunkte an den Proteinen bereits von anderen Stoffen besetzt ist oder wenn ein zweiter zugeführter Stoff mit dem ersten um die Haftpunkte konkurriert. KNOLL, KOMLÓS und TARDOS (37) konnten zeigen, dass die analgetische Wirkung von Morphin durch eine Reihe anderer Stoffe, die nicht analgetisch wirken z.B. auch Neostigmin und Atropin, gesteigert werden kann. Es gelang ihnen, nachzuweisen, dass diese Stoffe einen Teil der proteingebundenen Morphinmoleküle von den Serumproteinen verdrängen, sodass diese nunmehr effektiv in Erscheinung treten. Um diesen Mechanismus am Beispiel der Cholinesteraseblockierung zu studieren, wurde Patienten gegen Ende der Narkose (Epontol, Halothan, Lachgas) Neostigmin injiziert und nach einiger Zeit (20 - 30 min) Atropin verabreicht (0,5 mg i.v.) und der Verlauf der Cholinesterase-Aktivität im Serum verfolgt.

#### Ergebnis:

Sofort nach Injektion des Hemmers (Prostigmin) zeigt sich ein ungewöhnlich starker Abfall der SChE und alsbald ein rascher Anstieg der Enzymaktivität. Injiziert man nunmehr Atropin, so erfolgt erneut eine starke Blockierung der SChE, die ebenfalls nur kurze Zeit andauert. Die Atropininjektion imponiert im Kurvenbild wie eine zweite Injektion von Neostigmin (Abb. 8 und 9).

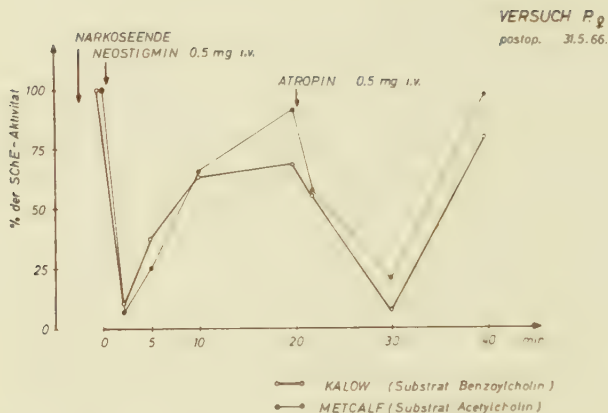


Abb. 8. Wirkung von Neostigmin und Atropin auf die SChE gegen Ende einer Narkose.

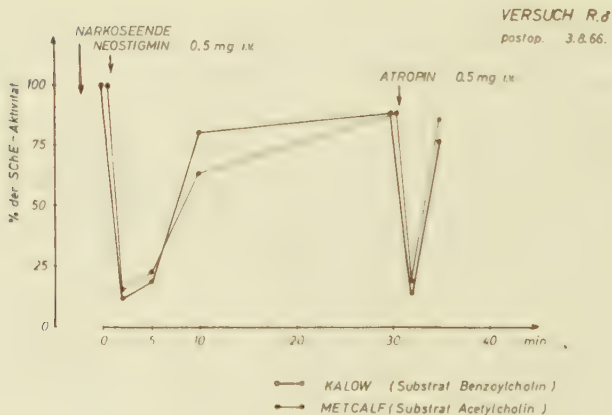


Abb. 9. Wirkung von Neostigmin und Atropin auf die SChE gegen Ende einer Narkose.

## Diskussion:

Zur Deutung dieses Phänomens wollen wir uns vergegenwärtigen, dass gegen Ende der Narkose die im Blut kreisenden Narkotika einen grossen Teil der Serumproteine besetzt halten, sodass die Abfangfunktion der Serumeiweisskörper grösstenteils ausgeschaltet ist. Die Cholinesterase ist demnach schutzlos der Wirkung des Hemmers ausgesetzt; dies führt zu der ungewöhnlich starken Blockierung der SChE. Entsprechend der hohen Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes erfolgt die Spaltung des Hemmers und die Reaktivierung des Enzyms rasch (steiler Anstieg im Kurvenbild). Injizieren wir nunmehr Atropin, so wird nochmals proteingebundener Hemmer freigesetzt, da Atropin das Neostigmin von den Eiweissmolekülen verdrängt, und führt zu einem erneuten Abfall der SChE-Aktivität. Der rasche Anstieg ist auch diesmal mit der raschen Spaltung infolge der hohen Konzentration des Inhibitor-Enzym-Komplexes zu erklären. Atropin - therapeutisch als Antidot zu Prostigmin angewandt - imponiert paradoxerweise im Kurvenbild der SChE wie eine erneute Prostigmin-Injektion. Es handelt sich dabei jedoch um eine ganz unspezifische Verdrängungsreaktion des Atropins, die spezifische Wirkung ist die kompetitive Verdrängung des Acetylcholins vom Rezeptor.

Die Serumproteine stellen also auch in dieser Hinsicht ein Puffersystem dar, das die Wirkung von zugeführten chemischen Stoffen bremst und abschwächt. Als Folge einer teilweisen Ausschaltung dieser Pufferfunktion zeigt das System der Ester spaltenden Enzyme eine ungewöhnliche Labilität gegenüber Hemmstoffen. Diesen Effekt, den Synergismus verschiedener Medikamente durch gegenseitige Verdrängung von den Serumproteinen, sollte der Arzt berücksichtigen, der im Anschluss an Narkosen Medikamente verabreicht oder gleichzeitig mehrere Therapeutika verwendet, die womöglich durch kompetitive Verdrängung von den Serumeiweisskörpern ihre Wirkung gegenseitig verstärken.

### Hemmung der SChE durch HEXAMARIUM (Ubretid)

Die klinisch-therapeutisch wichtigsten Cholinesterase-Hemmer gehören alle der Gruppe der Carbamate an. Einen neueren Hemmkörper dieser Art stellt das Hexamarium (BC 51, Ubretid) dar, eine Verbindung, der die Molekülstruktur des Pyridostigmins in doppelter Form - über eine Hexamethylenkette verbunden - zu Grunde liegt (chemische Formel siehe Abb. 2). Die pharmakologisch-klinischen Wirkungen dieses Hemmkörpers sind von HERZFELD, KRAUPP, PATEISKY und STUMPF (27) beschrieben worden. In der Literatur über klinische Erfahrungen mit Ubretid - nunmehr über 10 Jahre therapeutisch angewandt - wird über gute Erfolge bei der Prophylaxe und Therapie der postoperativen Darmatonie berichtet (10, 11, 55, 56), günstig wird die Tonuslage des harnableitenden Systems beeinflusst nach gynäkologischen Operationen (BRANDSTETTER, GITSCH, 22) und bei urologischen Erkrankungen (MERMON, 46), auch in der Behandlung neurologischer Krankheiten (Myasthenie) soll sich Ubretid bewährt haben (PATEISKY, KRAUPP, STUMPF, 49). Damit sind die wichtigsten Anwendungsgebiete und Indikationen für eine Therapie mit dem Cholinesterase-Hemmer Ubretid kurz umrissen. Als wichtigste Kriterien werden von allen Autoren die lange Wirkungszeit und die relativ gute Verträglichkeit angeführt.

Unsere klinisch-experimentellen Untersuchungen mit Hexamarium gelten der Frage nach Grad und Dauer der Hemmung der Serumcholinesterase in vivo und dem Verhalten in vitro im Vergleich mit durch Neostigmin blockierter Cholinesterase.

#### Versuchsanordnung:

Eine Versuchsperson erhält 0,5 mg Ubretid intravenös. Mittels einer Braunüle wird nach 2 min eine Blutprobe entnommen, nach dem Zentrifugieren wird das gewonnene Serum im Wasserbad von 37°C inkubiert und laufend davon Proben entnommen, die nach KALOW auf SChE untersucht werden. Parallel dazu werden weitere Blutproben entnommen zur Bestimmung der in-vivo-Werte der SChE (nach KALOW und METCALF). Das Verhalten der Serumcholinesterase

in vivo wird über mehrere Tage verfolgt.

### Ergebnisse:

Wie Abb. 10 zeigt, fällt der Cholinesterase-Spiegel in den ersten Stunden rasch ab, maximale Hemmung ist nach 2 - 4 Stunden erreicht, vom 2. Tag an erfolgt langsamer Anstieg der Enzymaktivität, zwischen dem 5. und 6. Tag wird der Ausgangswert wieder erreicht. Der Grad der Hemmung in den ersten Tagen beträgt 30 - 40 %, bei der Bestimmung nach METCALF findet man niedrigere SchE-Werte als bei der Messung nach KALOW. Eine Serie von Versuchen, bei denen Ubretid in gleicher Dosierung (0,5 mg) intramuskulär appliziert wurde, lieferte entsprechende Ergebnisse: Rascher Abfall in den ersten Stunden, 4 - 6 Tage Hemmung der Cholinesterase. Diese Resultate entsprechen den klinischen Erfahrungen und charakterisieren Ubretid als Langzeit-Hemmer mit therapeutischer Wirkung von 2 - 3 Tagen.

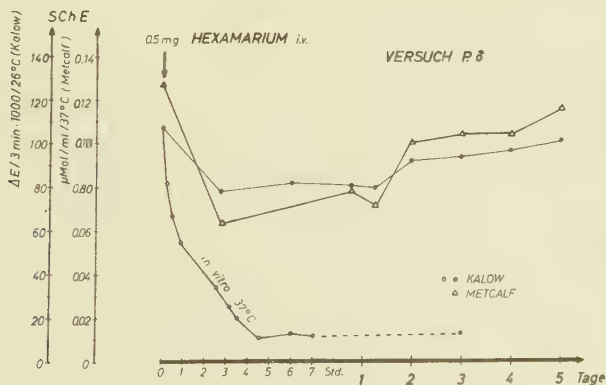


Abb. 10. SchE-Aktivität nach i.v. Injektion von 0,5 mg Hexamarium. Parallel dazu das in-vitro-Verhalten der SchE in dem 2 min nach Verabreichung des Hemmers gewonnenen Serum während Inkubation bei 37° C.

Bei Inkubation des 2 min nach der Injektion von Ubretid gewonnenen Serums im Wasserbad von  $37^{\circ}\text{C}$  finden wir während der ersten Stunden eine zunehmende Hemmung der SChE bis sich ein der Hemmstoffmenge im Serum entsprechender Endwert einstellt. Ein Vergleich mit dem Kurvenbild nach Neostigmin (Abb. 7) lässt auch hier deutlich werden, dass die in-vitro-Kurve unter den in vivo gefundenen Werten liegt. Das in-vitro-Verhalten der Serumcholinesterase nach Ubretid-Injektion bei Kühlschranktemperatur und den Einfluss einer unterschiedlich langen Vorinkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  zeigt Abb. 11 (Vergleiche hierzu Abb. 5 und 6). Im Vergleich mit den Reaktionen des chemisch ähnlich strukturierten Neostigmin nimmt die Hemmung durch Hexamarium längere Zeit in Anspruch, ferner können wir keine deutliche Tendenz zu einer Spontanreaktivierung in vitro beobachten. Da die Reaktionen zwischen Hexamarium und dem Enzym sehr viel langsamer ablaufen, sind die oben beschriebenen Vorkehrungen bei der Aktivitätsbestimmung nicht erforderlich.

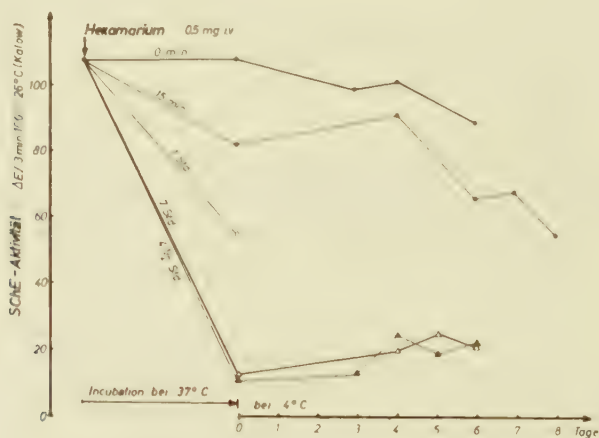


Abb. 11. SChE-Aktivität in einem 2 min nach i.v. Injektion von 0,5 mg Hexamarium gewonnenen Serum. 5 Fraktionen desselben Serums werden verschieden lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert und dann bei Kühlschranktemperatur weiter verfolgt.

Um die Reaktionen zwischen Inhibitor und Enzym *in vitro* genauer verfolgen zu können und eine eventuell auch nur geringgradige Spontanreaktivierung der mit Ubretid gehemmten Serumcholinesterase zu erfassen, setzten wir noch eine weitere Versuchsserie an.

#### Versuchsanordnung:

Patienten bzw. gesunde Versuchspersonen erhalten 0,5 mg Ubretid i.v. (bzw. 1 mg. i.m.) verabreicht. Nach 6 Stunden - also zu einem Zeitpunkt, wo wir dem therapeutischen Bereich entsprechend erniedrigte SChE-Werte erwarten können - wird eine grössere Menge Blut entnommen und die Cholinesterase-Aktivität im Serum bestimmt. Das den Hemmstoff enthaltende Serum und zur Kontrolle das Leerserum (vor der Injektion von Ubretid) wird im Kühlschrank aufbewahrt und über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen laufend auf Cholinesterase untersucht. Nach dieser Zeit werden beide Seren bei 37°C inkubiert bis maximal 20 Stunden und in stündlichen Abständen nach KALOW bestimmt.

#### Ergebnisse:

Ein typisches Kurvenbild aus dieser Versuchsserie zeigt Abb. 12. Nach 6 Stunden ist die SChE-Aktivität um etwa 30 % abgesunken (bei einer Dosierung von 0,5 mg Ubretid) bzw. um etwa 60 % nach 1 mg Ubretid. Weder bei Kühlschranktemperatur noch während der Inkubation ist eine deutliche Tendenz zum Ansteigen der Enzymaktivität zu erkennen. Die geringen Schwankungen nach oben und unten liegen im Bereich der Messfehlergrenzen der Bestimmungsmethode. Die mitkontrollierten Leerseren zeigen während der Beobachtungszeit nur geringfügiges Absinken der SChE-Aktivität, in einigen Proben nimmt die Aktivität sogar leicht zu.

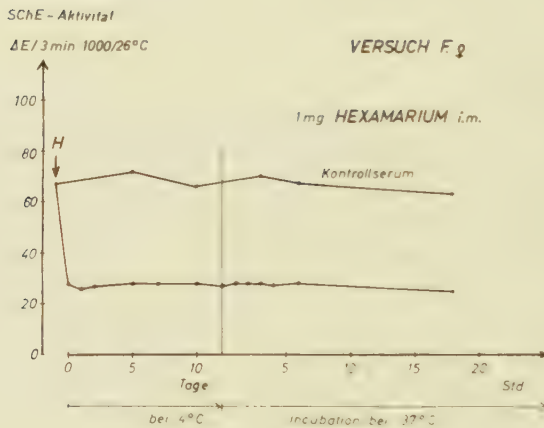


Abb. 12. In-vitro-Verhalten eines 6 St. nach i.m. Injektion von 1 mg Hexamarium gewonnenen Serums bei Kühlschranktemperatur ( $4^\circ\text{C}$ ) und während Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ .

### Diskussion:

Wir sahen, dass die einmalige Verabreichung des mit Neostigmin chemisch verwandten Cholinesterase-Hemmers Hexamarium eine ca. 6 Tage andauernde Aktivitätsminderung der SChE bewirkt. Im Gegensatz zu Neostigmin ist in einem durch Hexamarium gehemmten Serum keine Spontanreaktivierung zu beobachten. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Wirkung des Hexamariums auf die Serumcholinesterase ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muss. Unsere Untersuchungen berechtigen zu der Annahme, dass durch Hexamarium ein Teil der SChE irreversibel blockiert wird; der langsame Wiederanstieg des Esterase-Spiegels im Serum, der nur in vivo zu beobachten ist, würde sich demnach durch Neubildung und Nachlieferung von neuen Enzymmolekülen durch die Leber er-

klären lassen, während die durch Hexamarium irreversibel blockierten Cholinesterasemoleküle abgebaut und eliminiert werden. Hexamarium wäre demnach ein irreversibler Cholinesterase-Hemmer. Über den Begriff " reversible bzw. irreversible Hemmung" der Cholinesterase herrscht in der Literatur keine Übereinstimmung. Einerseits wird die Bezeichnung reversible Hemmer nur für solche Verbindungen zugelassen, die vorübergehend zu der anionischen Gruppe des Enzymmoleküls Beziehung aufnehmen und alsbald wieder abdissoziieren, ohne dass eigentliche chemische Umsetzungen erfolgen (substituierende Ammoniumionen, prothetische Anticholinesterasen nach WILSON, 65), während zu den irreversiblen Hemmern jene Stoffe gerechnet werden, die Säurereste übertragen (oxydiaphorische Inhibitoren), die vom Enzym hydrolytisch abgespalten werden müssen. WILSON rechnet hierzu nicht nur die Polyalkylphosphate und Methansulfonate, sondern auch die Carbamate wie Neostigmin und Hexamarium. Andere Autoren berichten über reversible Hemmung der Cholinesterase durch Alkylphosphate (FRIEDBERG, ERDMANN, 20) - teilweise eine Wirkung der Phosphatasen - und rechnen auch die Carbamate zu den reversiblen Hemmkörpern. STEFENELLI (61) bezeichnet Ubretid ausdrücklich als reversiblen Cholinesterase-Hemmer. Die Erklärung dieses Widerspruches ist in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und Versuchsbedingungen in vitro zu suchen (ge-reinigte Enzympräparate oder Nativseren, Art des Substrats, Substratkonzentration, pH usw.). Variiert man die Versuchsbedingungen, so lässt sich in vielen Fällen eine Verdrängung des Hemmers vom Enzym und eine Reaktivierung des Fermentes erzwingen. Im lebenden Organismus schliesslich wird sich nach jeder partiellen Ausschaltung der Cholinesterase, sofern sie nicht zum Tode führt, nach einiger Zeit durch Nachlieferung von neu synthetisiertem Enzym der Cholinesterase-Spiegel im Serum normalisieren, die Hemmung ist demnach in jedem Fall reversibel. Da keine allgemein verbindliche Definition der Begriffe "reversibel" und "irreversibel" vorliegt, wollen wir in unseren mehr klinisch ausgerichteten Untersuchungen nur dann von reversibler Hemmung sprechen, wenn im Reagenzglas im Nativserum, also unter möglichst physiologischen Bedingungen, allein durch

chemisch-enzymatische Vorgänge eine spontane Reaktivierung der zunächst gehemmten Cholinesterase zu beobachten ist und die Bezeichnung irreversible Hemmung jenen Fällen vorbehalten, wo trotz längerer Inkubation, aber ohne Änderung der physiologischen Bedingungen kein Anstieg der Enzymaktivität festgestellt werden kann. In dieser Hinsicht verhalten sich Neostigmin und Hexamarium, beide Cholinesterase-Hemmer vom Typ der Carbamate, ganz verschieden, was klinisch wichtige Konsequenzen hat.

Der Vergleich der Molekülstrukturen der beiden Hemmkörper (Abb. 2) regt zu einem Deutungsversuch der unterschiedlichen Wirkung dieser beiden Substanzen an. Das langgestreckte Molekül des Hexamariums besitzt an beiden Enden je einen "kationischen Kopf in Form von quaternärem Stickstoff. Diese Gruppe ist es, die zu der anionischen Seite des Enzymmoleküls Beziehung aufnimmt, worauf der Hemmer an das Ferment angelagert und ausgerichtet wird. Da nach BERGMANN die Serumcholinesterase nur eine anionische und eine esteratische Seite besitzt, sind theoretisch zwei Reaktionen zwischen Hexamarium und dem Enzym möglich: Der eine kationische Kopf des Hexamariums wird an das Enzym angelagert, der andere bleibt frei und erschwert zusammen mit der Hexamethylengruppe die Annäherung von Wassermolekülen und die hydrolytische Abspaltung des Carbamylrestes; oder die beiden kationischen Köpfe lagern sich an zwei Enzymmoleküle an, die dadurch über eine Brücke miteinander verkettet werden. Vielleicht ist dieser Komplex - zwei Carbamylenzyme über eine Hexamethylenkette miteinander verbunden - besonders stabil und kann unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden.

Aus unseren experimentellen Ergebnissen den Schluss zu ziehen, Hexamarium sei eine besonders gefährliche Substanz, und von der Therapie abzuraten, erscheint nicht berechtigt; die klinischen Erfahrungen sprechen dagegen. Der Arzt, der Hexamarium therapeutisch anwendet, sollte sich jedoch bewusst sein, dass hierdurch ein Teil der Serumcholinesterase irrever-

sibel gehemmt wird und dass damit ein Prozess in Gang gesetzt wird, der erst nach einer Woche abgeklungen ist. Der Nachteil des Neostigmins, den Hemmer in kurzen Zeitabständen wiederholt verabreichen zu müssen, erscheint daneben gering. Hexamarium als Parasympathicomimeticum sollte daher einer strengeren Indikation vorbehalten bleiben!

## ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Es wird auf die Fehlerquellen hingewiesen, die bei der Bestimmung der tatsächlichen Serumcholinesterase-Aktivität nach Verabreichung von Hemmkörpern möglich sind, da die Reaktion zwischen Enzym und Inhibitor vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur Messung in vitro weiterläuft. Schnelles Arbeiten und sofortige Abkühlung der Blutproben liefern Messwerte, die den tatsächlichen Aktivitätsverhältnissen näherkommen. Diese Vorkehrungen sind besonders zu beachten bei Untersuchungen mit dem kurz wirkenden Cholinesterasehemmer Neostigmin, während wir diesen Effekt bei dem Langzeithemmer Hexamarium vernachlässigen können.
- 2.) Bei kombinierten in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen beobachten wir nach Neostigmin (0,5 mg i.v.) eine Hemmung der Serumcholinesterase über einen Zeitraum von 30 - 90 min, die in-vitro-Werte liegen durchwegs unter den entsprechenden in-vivo-Werten. Sowohl bei Inkubation im Wasserbad von 37°C als auch bei Kühlschranktemperatur (4°C) ist im Reagenzglas eine vollständige Reaktivierung der zunächst durch Neostigmin gehemmten Cholinesterase zu beobachten.
- 3.) Da der grösste Anteil des zugeführten Neostigmins an Serumproteine gebunden wird, kann eine Reihe anderer Medikamente durch kompetitive Verdrängung von den Eiweisskörpern Neostigmin freisetzen und dessen Wirksamkeit verstärken. Dieser Effekt ist besonders im Anschluss an Narkosen zu beobachten, da die im Blut abströmenden Narkotika einen Teil der Serum-Eiweisskörper besetzt halten.
- 4.) Hexamarium hemmt die Serumcholinesterase über einen Zeitraum von ca. 6 Tagen; eine therapeutisch wirksame Hemmung ist in den ersten 2 - 3 Tagen zu beobachten. Durch Hexamarium gehemmte Serumcholinesterase gewinnt im Reagenzglas weder bei Kühlschranktemperatur noch nach stundenlanger Inkubation bei 37°C ihre Aktivität zurück. Hexamarium muss daher als irreversibler Cholinesterase-Hemmer angesprochen werden.

### Literatur

1. ADAMS, D.H., WHITTAKER, V.P.: Biochem. Biophys. Acta 3, 358, 1948.
2. ALLES, G.A. und HAWES, R.C.: J.biol. chem. 133, 375, 1940.
3. AMMON, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486, 1934.
4. AMMON, R. und DIRSCHERL, W.: Fermente-Hormone-Vitamine Bd.I Fermente, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1961.
5. AUGUSTINSSON, K.B.: Cholinesterases; a study in comparative enzymology, Acta physiol.scand. 15, Sup 57, 1948.
6. BARROW, M.E.H. und JOHNSON, J.K.: A study of the anti-cholinesterase and anticurare effects of some cholinesterase inhibitors. Brit. J. Anaesth. 38, 420, 1966.
7. BREUER, H. und SCHONFELDER, M.: Untersuchung über die Beteiligung der Cholinesterase und Acetylcholinesterase an der Spaltung von Acetylcholin im Serum. Clin. Chim. Acta 6, 515, 1961.
8. CHESSICK, R.D.: The histochemical specificity of Cholinesterase. J.Histochem. and Cytochem. 2, 258, 1954.
9. CHURCHILL-DAVIDSON, H.G. and GRIFFITH, W.J.: Simple test-paper method for the clinical determination of pseudo-cholinesterase. Brit.Med.J. 14, 994, 1961.
10. DANIEL, W. und PROCKL, K.: Postoperative Darmperistaltiktherapie mit einem neuen Cholinesterase-Hemmkörper. Wien. klin. Wschr. 75, 795, 1963.
11. DEIMER, E. und PARTILLA, H.: Ubretid und Obstipation, Kapazität und Tonuslage des Dickdarms unter Beeinflussung eines Cholinesterasehemmkörpers. Wien. klin. Wschr. 52, 927, 1963.
12. DETTBARN, W.D.: Distinction between action on acetylcholinesterase and on acetylcholin receptor in axons. Biochem. Biophys. Acta 79, 629, 1964.

13. DIXON, M. und WEBB, C.E.: Enzymes. Longmans, Green & Co., London 1965.
14. DOENICKE, A. und HOLLE, F.: Das Verhalten der Leberfunktion im postoperativen Schock. Fortschr. Med. 80, 253, 1962.
15. DOENICKE, A., GURTNER, Th., REMES, I., SPIESS, W., STEINBEREITHER, K.: Kasuistischer Beitrag zum familiären Vorkommen von Cholinesterase-Varianten. 1. Europ. Kongr. f. Anästh., Wien, 2, 191, 1962.
16. DOENICKE, A., GURTNER, Th., KREUTZBERG, G., REMES, I., SPIESS, W., STEINBEREITHER, K.: Serum Cholinesterase Anenzymia. Acta anaesth. Scandinav. 7, 59, 1963.
17. DOENICKE, A., SCHMIDINGER, St.: Der diagnostische Wert der Serumcholinesterase-Bestimmung. Med.Klinik 60, 2012, 1961.
18. FABER, M.: Studier over serumcholinesterasens variationer, Diss. ext. Kopenhagen 1941.
19. FABER, M.: The relationship between serumcholinesterase and serumalbumin. Acta med. Scandinav. 2, 188, 1943.
20. FRIEDBERG, K.D. und ERDMANN, W.D.: Spontane Reaktivierung durch Alkylphosphate blockierter Cholinesterase in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pharm. 237, 1, 1959.
21. GILMAN, A. und KOELLE, G.B.: Anticholinesterase drugs. Pharmacol. Rev. 1, 166, 1949.
22. GITSCH, E. und BRANDSTETTER, F.: Fortschritte in der medikamentösen Behandlung der weiblichen funktionellen Harninkontinenz. Arch. f. Gyn. 188, 234, 1957.
23. GRAVENSTEIN, I.S. und PERKINS, H.M.: The effect of Neostigmine, Atropine and Ephedrine on heart rate in man. Anesthesiology 27, 298, 1966.

24. GURTNER, Th., KREUTZBERG, G. und DOENICKE, A.: Comparative studies on cholinesterase activity in serum and in liver cells. *Acta. anaesth. Scandinav.* 7, 69, 1963.
25. HAGIWARA YOSHIMI: Benzoylcholinesterase. Activation of non-specific cholinesterase by polyhydric alcohols. *Jap. J. Pharm.* 2, 137, 1960.
26. HART, S.M., MITCHELL, I.V.: Suxamethonium in the absence of pseudocholinesterase. *Brit. J. Anesth.* 34, 207, 1962.
27. HERZFELD, E., KRAUPP, O., PATEISKY, K., STUMPF, Ch.: Pharmakologische und klinische Wirkungen des Cholinesterasehemmkörpers Hexamethylen-bis (N-methyl-carbaminoyl-1-methyl-3-oxy-pyridiniumbromid) (BC 51). *Wien. klin. Wschr.* 14, 245, 1957.
28. HESTRIN, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. *J. Biol. Chem.* 180, 249, 1949.
29. HO, A.K.S., FREEMAN, S.E.: Anticholinesterase activity of Tetrahydroaminacrine and Succinylcholine hydrolysis. *Nature*, 205, 1118, 1965.
30. HORLEIN, H. und PILZ, W.: *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.* 327, 256, 1962.
31. JAMIESON, D.: The function of true and pseudocholinesterase in the mammalian ileum. *Biochem. Pharm.* 12, 693, 1963.
32. KALOW, W., LINDSAY, H.A.: A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 33, 568, 1955.
33. KALOW, W., GENEST, K., STARON, N.: Kinetic studies on the hydrolysis of benzoylcholine by human serum cholinesterase. *Canad. J. Biochem.* 34, 637, 1956.
34. KALOW, W., GENEST, K.: A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination

- of dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 339, 1957.
35. KECKWICK, R.G.O.: Serumcholinesterase activity in health and in liver disease. *Biochem. J.* 76, 420, 1960.
36. KIESEWETTER, E.: Atem- und kreislaufphysiologische Untersuchungen mit einem Cholinesterasehemmkörper. *Wien. klin. Wschr.* 9, 158, 1965.
37. KNOLL, J., KOMLÓS, E., TARDOS, L.: Über die Rolle der Eiweissbindung im Synergismus der Analgetika und Parasympathicomimetica. *Acta Physiolg. Hung.* 4, 131, 1955.
38. KOELLE, G.B., KOELLE, E.S., FRIEDENWALD, J.S.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* 100, 180, 1950.
39. LATKI, O., ERDMANN, W.D.: Hemmung und Reaktivierung von Cholinesterasen nach Vergiftung mit Paraoxon und DFP in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharm.* 240, 514, 1961.
40. LIDDELL, I., LEHMANN, H., SILK, E.: A silent pseudocholinesterase gene. *Nature*, 193, 561, 1962.
41. LOEWI, O., NAVRATIL: *Pflügers Arch. Physiol.* 214, 678, 1926.
42. MAIER, E.H., BAMMER, H.G.: Qualitative Studien über die Aktivitätshemmung der Erythrozyten-Cholinesterase durch Prostigmin und Cholin. *Biochem. Zeitschr.* 322, 85, 1951.
43. MAIER, E.H.: Serum-Cholinesterase und Lebererkrankungen. *Dtsch. med. Wschr.* 81, 1674, 1956.
44. MARTON, A., KALOW, W.: Studies on aromatic esterase and cholinesterase of human serum. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 37, 1367, 1959.
45. MENDEL, B., MUNDELL, D.B., RUDNEY, H.: *Biochem. J.* 37, 473, 1943.
46. MERMON, R.: Blasenmanometrie und detaillierte Sphinkterometrie bei Funktionsstörung der Harnblase sowie deren Therapie. *Wien. klin. Wschr.* 2, 29, 1962.

47. METCALF, R.L.: The colorimetric microestimation of human blood cholinesterase and its application to poisoning by organic insecticides. J. Econ. Ent. 44, 883, 1951.
48. NACHMANSOHN, D.: Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung. Er. Physiol. 48, 575, 1955.
49. PATEISKY, K., KRAUPP, O., STUMPF, Ch.: Klinische Erfahrungen mit Hexamethylen-bis-(N-methyl-carbaminoyl-m-trimethyl-ammoniumphenol) BC 40, bei Myasthenia gravis pseudoparalytica. Wien. klin. Wschr. 32, 578, 1955.
50. PATEISKY, K.: Elektromyographische Untersuchungen zur Indikation und Behandlung poliomyelitischer Lähmungen mit Cholinesterasehemmkörpern. Wien. med. Wschr. 9, 185, 1957.
51. PILZ, W.: Klin. Wschr. 36, 1017, 1958.
52. PILZ, W.: Acetylcholinesterase, Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GmbH. Weinheim.
53. PILZ, W., HORLEIN, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 256, 1962.
54. PILZ, W., HORLEIN, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 157, 1964.
55. ROPPOLT, H. und NEUGEBAUER, G.: Die Behandlung der postoperativen Darmatonie mit Ubretid. Wien. klin. Wschr. 15, 269, 1965.
56. ROTHNER, O.: Zur Behandlung der postoperativen Darmatonie mit einem neuen Parasympathicomimeticum. Wien. klin. Wschr. 6, 101, 1964.
57. SAILER, S., BRAUNSTEINER, St.: Über eine neue, sehr einfache Methode zur Bestimmung der Serumcholinesterase und ihre klinische Bedeutung. Klin. Wschr. 37, 986, 1959.
58. SCHAUMANN, W.: Vergleich zwischen der Wirksamkeit von Cholinesterasehemmern in vitro und in vivo. Naunyn-Schmiede-

- berg's Arch. exp. Path. u. Pharm. 239, 126, 1960.
59. SCHAUMANN, W.: Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in vitro und Berechnung der Aktivität in vivo nach Vergiftung mit Alkylphosphaten. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharm. 239, 81, 1960.
  60. STEDMAN, STEDMAN und EASON: Biochem. J. London, 26, 2056, 1932.
  61. STEFENELLI, N. und WEWALKA, F.: Cholinesterasehemmung bei Leberkrankheiten durch zusätzliche Belastung mit BC51 (Ubretid). Wien. klin. Wschr. 42, 808, 1958.
  62. STEFENELLI, N.: Die Korrelation zwischen dem Albumingehalt und der Cholinesteraseaktivität des Blutserums und ihre Beurteilung bei Albuminverlust. Klin. Wschr. 39, 1019, 1961.
  63. SUNDWALL, A.: Pharmacological studies of cholinesterase reactivating oximes. Diss. ext. Stockholm 1962.
  64. WILSON, I.B.: Acetylcholinesterase XII Further studies on binding forces. J. Biol. Chem. 197, 215, 1952.
  65. WILSON, I.B., ALEXANDER, J.: Acetylcholinesterase: Reversible inhibitors, substrate inhibition. J. Biol. Chem. 237, 1323, 1962.
  66. WOLFF, H.: Die Hemmung der Serumcholinesterase durch Cyclophosphamid (Endoxan). Klin. Wschr. 15, 819, 1965.

Herrn Prof. Dr. med. F. Holle, dem Direktor der chirurgischen Poliklinik der Universität München, danke ich für die Ueberlassung eines Arbeitsplatzes! Dem Leiter der Anästhesieabteilung, Priv.Do. Dr. med. A. Doenicke, der diese Arbeit anregte, allzeit mit regem Interesse verfolgte und mit wissenschaftlichen Ratschlägen förderte, gilt mein besonderer Dank!

### Lebenslauf

Ich wurde am 4.2.1942 als Sohn des Dipl.Kaufmanns Franz Präuer in Marienbad/Böhmen geboren. Seit 1946 befinde ich mich in Bayern. Nach dem Besuch der Volksschule in Kirchweidach besuchte ich die humanistischen Gymnasien in Burghausen und Landshut, zuletzt das Wilhelmsgymnasium zu München, wo ich im Juli 1961 die Reifeprüfung ablegte. Im November 1961 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München als Student der Medizin. Im Oktober 1962 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Februar 1964 die ärztliche Vorprüfung ab. Die folgenden 6 klinischen Semester studierte ich ebenfalls an der Universität München. Während meiner klinischen Ausbildungszeit hatte ich Gelegenheit, als Austausch-Famulant in Frankreich (Hôpitaux St. Eloi, Montpellier) und Griechenland (Athen, Rhodos) zu praktizieren. Am 22. Juni 1967 legte ich die ärztliche Prüfung ab. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent an der Poliklinik der Universität München beschäftigt.

